

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06141849 A**

(43) Date of publication of application: **24 . 05 . 94**

(51) Int. Cl

C12N 1/20
A23K 1/16
A61K 37/20
C08B 37/00
//(C12N 1/20 , C12R 1:01)

(21) Application number: **04333436**

(22) Date of filing: **30 . 10 . 92**

(71) Applicant: **SOMA GENICHIRO MIZUNO
DENICHI**

(72) Inventor: **SOMA GENICHIRO
MIZUNO DENICHI
INAGAWA HIROYUKI
NISHIZAWA TAKASHI**

(54) **LPS PRODUCING BACTERIUM, LPS,
IMMUNOLOGICAL FUNCTION ACTIVATOR AND
IMMUNOLOGICAL FUNCTION ACTIVATOR FOR
ANIMAL**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new LPS having high immunological function activating ability, extremely low toxicity, high chemotherapy coefficient, usable for a long period of time, capable of being administered through oral, percutaneous or injection route and being supplied in a large amount at low manufacturing cost, a

new bacterium to produce the LPS, a new immunological function activator containing the LPS and an immunological function activator for animal.

CONSTITUTION: This LPS has the following physical properties and the bacterium produces the LPS. Molecular weight: $5,000 \pm 1,500$ (by tricine-SDS-PAGE method). The number of mole of phosphorus: 2.0 ± 1 /molecular weight 5,000. The number of mols of hexosamine: 9.1 ± 1 /molecular weight 5,000. The number of mols of KDO: 0.8 ± 0.5 /molecular weight 5,000.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-141849

(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

(51)Int.Cl.⁵
C 1 2 N 1/20
A 2 3 K 1/16
A 6 1 K 37/20
C 0 8 B 37/00
// (C 1 2 N 1/20

識別記号
A 7236-4B
3 0 4 B 9123-2B
A B D 8314-4C
P 7329-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4(全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平4-333436

(71)出願人 390025210

杣 源一郎

東京都世田谷区東玉川1-10-21

(22)出願日

平成4年(1992)10月30日

(71)出願人 000193553

水野 伝一

神奈川県鎌倉市岡本18

(72)発明者 杣 源一郎

東京都世田谷区東玉川1-10-21

(72)発明者 水野 伝一

神奈川県鎌倉市岡本18

(72)発明者 稲川 裕之

東京都町田市成瀬2-11-1 ポプラケ丘コ
ーブ7-302

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 LPS産生菌、LPS、免疫機能活性化剤及び動物用免疫機能活性化剤

(57)【要約】

【目的】 高い免疫機能活性化能を有し、極めて低毒性で、化学治療係数が高く、長期使用が可能であり、経口、経皮、注射のいずれの経路でも投与可能であり、しかも、生産コストが安く、大量に供給可能な新規なLPS、それを産生する新規な細菌、同LPSを含む新規な免疫機能活性化剤及び動物用免疫機能活性化剤を提供する。

【構成】 次の物性を有するLPS及びそれを産生する細菌を特徴とする。

分子量: 5,000±1,500 (トリシン-SDS-PAGE法による)

リンモル数: 2.0±1/分子量5,000

ヘキソサミンモル数: 9.1±1/分子量5,000

KDOモル数: 0.8±0.5/分子量5,000

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の性質を有するLPS産生グラム陰性菌。

(a) 形態

① 30°Cでの運動性あり

② グラム染色性: -

(b) 生育状態

① トリプトソーヤ寒天培地: 白色～淡黄色コロニーを形成する。

(c) 生理的性質

① インドール生成: +

② フォーグス・プロスカウエル反応: +

③ 硝酸還元: +

④ 硫化水素生成: ±

⑤ エスクリン加水分解: +

⑥ D-グルコースからの気体発生: +

⑦ リジンデカルボキシラーゼ: ±

⑧ アルギニンジヒドロラーゼ: +

⑨ オルニチンデカルボキシラーゼ: -

▲ 10 ▼ フェニルアラニンデアミナーゼ: -

▲ 11 ▼ デオキシリボヌクレアーゼ: +

▲ 12 ▼ コバックオキシダーゼ: +

▲ 13 ▼ β-ガラクトシダーゼ: +

▲ 14 ▼ ワレアーゼ: -

(d) 利用能

① シモンズクエン酸: ±

② マロン酸: -

③ イノシトール: -

④ シュクロース: ±

⑤ アドニトール: -

⑥ ラフィノース: -

⑦ L-アラビノース: +

⑧ D-マンニトール: ±

⑨ L-ラムノース: -

▲ 10 ▼ D-ソルビトール: -

【請求項2】 次の物性を示す、請求項1記載の細菌に由来するLPS。

分子量: 5,000 ± 1,500 (トリシン-SDS-PAGE法による)

リンモル数: 2.0 ± 1 / 分子量 5,000

ヘキソサミンモル数: 9.1 ± 1 / 分子量 5,000

KDOモル数: 0.8 ± 0.5 / 分子量 5,000

【請求項3】 請求項2に記載のLPSを含む免疫機能活性化剤。

【請求項4】 請求項2に記載のLPSを含む動物用免疫機能活性化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なLPS産生菌、新規なLPS、新規なLPSを含む医薬及び動物薬に関する

する。

【0002】 より詳細には、本発明は、LPSを产生する新規なグラム陰性菌、それに由来する新規なLPS、及びそのLPSを含む新規な免疫機能活性化剤及び動物用免疫機能活性化剤に関する。

【0003】

【従来の技術】 生物には、生体の内部環境が外来性及び内因性の異物によって擾乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫機能が備わっている。従って、免疫機能の低下は健康の悪化、各種疾病の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病的発病阻止、治癒、老化防止につながる。

【0004】 このため、免疫機能を活性化させる物質の提供が要請されており、現在、PSK [別名クレスチン (吳羽化学株式会社の登録商標)]、レンチナン (味の素株式会社の登録商標)、ベスタチン (日本化薬株式会社の登録商標)、ソニフィラン (科研製薬株式会社の登録商標)、OK-432 [キャンサー ケモセラビーレポートウ パートウ 1 (Cancer Chemotherapy Report Part 1)、Vol. 1.58、No. 1、10頁 (1972)、別名ビシバニール (中外製薬株式会社の登録商標)] 等が知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従来の免疫機能活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ベスタチン、ソニフィランはTNF産生能がないので、それらの免疫機能活性化能は低い。一方、OK-432にはTNF産生能があるが、大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法係数が小さい。更に、簡便な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上の便宜に欠ける。ここで、「TNF」とは、マクロファージにより產生される腫瘍障害因子 (Tumor Necrosis Factor) の総称 [ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biol. Chem.)、260、2345～2354頁 (1985年)] であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその產生量は増していく。「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアーベ状細胞の総称である。

【0006】かかる従来の免疫機能活性化剤の欠点を解消すべく、新たな免疫機能活性化剤として、菌源或いは植物源のLPSが免疫機能促進剤として提案され、又、新たなLPS産生菌も紹介されている [特願平2-25192号出願 (特開平3-218466号公報)、特願平2-218599号出願 (特開平4-99481号公報)、特願平2-315959号出願 (特開平4-18

7640号公報)】。

【0007】本発明は、新規なLPS産生菌、それにより産生される新規なLPS、それを含む新規な免疫機能活性化剤及び動物用の新規な免疫機能活性化剤を提供することを技術的課題とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、高い免疫機能活性化能を有し、極めて低毒性で、化学治療係数が高く、長期使用が可能であり、経口、経皮、注射のいずれの経路でも投与可能であり、しかも、生産コストが安く、大量に供給可能な新規なLPSを産生する新規な細菌の分離手段、同細菌の培養液からの新規なLPSの抽出、精製手段、そのLPSを含む免疫機能活性化剤及び動物用免疫機能活性化剤の調製手段を提供することにより達成される。

【0009】細菌分離源

本発明の細菌は、神奈川県川崎市宮前区野川に所在する帝京大学生物工学研究センターの付近の水たまりから1991年12月に分離されたものであり、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成4年10月30日から微工研条寄第4059号としてブダペスト条約に従って国際寄託されている。次の特性を示すことから、アエロモナスヒドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*) 種に属すると推定される。

【0010】(a) 形態

① 30°Cでの運動性あり

② グラム染色性: -

(b) 生育状態

① トリプトソーヤ寒天培地: 白色～淡黄色コロニーを形成する。

(c) 生理的性質

① インドール生成: +

② フォーグス・プロスカウエル反応: +

③ 硝酸還元: +

④ 硫化水素生成: 土

⑤ エスクリン加水分解: +

⑥ D-グルコースからの気体発生: +

⑦ リジンデカルボキシラーゼ: 土

⑧ アルギニンジヒドロラーゼ: +

⑨ オルニチンデカルボキシラーゼ: -

△ 10△フェニルアラニンデアミナーゼ: -

△ 11△デオキシリボヌクレアーゼ: +

△ 12△コバックオキシダーゼ: +

△ 13△β-ガラクトシダーゼ: +

△ 14△ウレアーゼ: -

(d) 利用能

① シモンズクエン酸: 土

② マロン酸: -

③ イノシトール: -

④ シュクロース: 土

⑤ アドニトール: -

⑥ ラフィノース: -

⑦ L-アラビノース: +

⑧ D-マンニトール: 土

⑨ L-ラムノース: -

△ 10△D-ソルビトール: -

上記において「土」は判定不能であったことを示す。

【0011】本発明の細菌は、標準寒天培地なら特に問題なく培養可能である。例えば、IFOの培地リストの

10 802に該当する培地、日本製薬株式会社から市販されているトリプトソーヤ寒天培地、或いは、次組成を有する培地(以下、LB培地と称す)を使用できる。例えば、トリプトソーヤ寒天培地にまくと、白色～淡黄色のコロニーを形成する。

【0012】

バクトトリプトン(ディフコ社製) 10.0g

バクト酵母エキス(ディフコ社製) 5.0g

NaCl(和光純薬株式会社製) 10.0g

蒸留水 残(全量を1.

20 0リットルとする量)

【0013】トリプトソーヤ寒天培地の組成は次の通りである。

ペプトン 15.0g

ダイズペプトン 5.0g

NaCl 5.0g

寒天 15.0g

蒸留水 残(全量を1.0リットルとする量)

【0014】LPSの產生

30 上記細菌を液体培養すると、本発明のLPS(以下、LPSaと称す)が産生される。この液体培養の際の条件も特に限定されることはない。例えば、LB培地で約30°Cで12時間程度振とう培養すればよい。

【0015】LPSの精製

培養後に集菌し、ウェストファル(Westphal)

等が「メソッズ インカーボハイドレート ケミストリー

—(Methods in Carbohydrate Chemistry) のVol. V [米国ニューヨー

40 クのアカデミック プレス(Academic Press)社が1965年に発行]の83頁に記載した熱フ

エノール法を用い、更に、必要に応じて、陰イオン交換クロマトグラフィー等で精製すればよい。

【0016】即ち、菌体を蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の熱フェノールと共に攪拌する。次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、限外ろ過により濃縮して粗LPS画分を分取し、この画分を常法に従い、例えば、ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース(Sephadex)、Q-セファロ

50 ース(Sephadex)を使用して陰イオン交換ク

ロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って脱塩すると、純度93%以上の精製標品が得られる。

【0017】LPSの物性

追って実施例で詳述するが、本発明のLPS（93%以上純度標品）の物性は次の通りである。（トリシン-SDS-PAGE法は実施例で定義する）

分子量：5,000±1,500（トリシン-SDS-PAGE法による）

リンモル数：2.0±1／分子量5,000

ヘキソサミンモル数：9.1±1／分子量5,000

KDOモル数：0.8±0.5／分子量5,000

全糖含量：37.0重量%

夾雜蛋白量：2.98重量%

夾雜核酸量：3.68重量%未満

【0018】提供の形態

本発明のLPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

【0019】免疫活性化能の測定

本発明のLPSの免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての内因性TNFの產生促進能、產生能より確認できる。

【0020】動物体内にTNFを產生させるためには、產生前駆（プライミング）段階と產生開始（トリガリング）段階が必要であることは、カーズウェル（Carswell）らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）、72、3666～3670頁（1975年）に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」（内因性TNF產生促進剤）であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」（内因性TNF產生剤）である。

【0021】TNF活性は、L-929細胞【プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー-72、3666～3670頁】に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

【0022】L929細胞を、5%仔牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地（以下、MEM培地と表す）で育成し、 8×10^4 個の細胞が $100\mu\text{l}$ の同上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は 37°C 、2時間、5% CO_2 、100% H_2O であり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクチノマイシンDを培地中に終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、培養液の液量を $150\mu\text{l}$ とする。即座に、検体を適当にMEM培地

で稀釈したものを $50\mu\text{l}$ 加える（この際稀釈率を適宜調製し、ED₅₀を求める事ができる）。更に、最終液量 $200\mu\text{l}$ となったL929細胞を上記条件で18時間培養する。

【0023】細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、

10 生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD（590nm）での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。

【0024】L929細胞が50%生存できる検体の稀釈率（N）を求める。対照としてウサギTNS【腫瘍障害血清（Tumor Necrosis Serum）】を使用し、このウサギTNSの活性n（単位/m¹）を 2.4×10^6 単位/mg/mlのTNF- α を用いて決定する。このウサギTNSのED₅₀を与える20 稀釈率（C）を求める。検体活性（単位/m¹）は $N/C \times n$ で計算する。

【0025】本発明のLPSは、その意図される用途が阻害されない限り、他LPSと、更には他のいずれの物質とも組み合わせて使用できる。

【0026】本発明のLPSを含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤のいずれもが、常法の製剤技術或は動物薬製造の常法により、経口薬、静注薬、筋注薬、経皮薬として単独で、或いは他薬との配合物として、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼付剤、軟膏剤、リニメント剤、ローション剤、坐剤、注射剤等の形態で提供できる。特に、皮膚にはマクロファージが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飲水添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤か顆粒剤とすることが好ましい。なお、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために澱粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。

【0027】本発明のLPSを含む飼料添加剤、プレミックス製剤を添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加物を含む飼料であってもよい。

【0028】これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法に従って、賦形剤、保存剤、緩衝剤等の添加剤を加えることができる。更に、矯味剤、矯臭剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンを使用できる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等の50 パラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウ

ム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、ブロピルパラベン等を使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。以下、実施例、実験例により、本発明を更に詳細に説明する。なお、使用された「大腸菌LPS」は、米国ディフコ (Difco) 社製0127:B8である。

【0029】実施例1

本発明の細菌を、トリプトソーヤ寒天培地にまき1晩30°Cで培養した。形成された7つのコロニーのうちで、白色～淡黄色を呈し、グラム陰性を示したコロニーから1エーゼ分を分取し、3リットル容坂口プラスコ中の1リットルのLB培地で18時間、30°Cで振とう培養した。高速遠心分離機(日立Himac SCR20B)で、6,000 rpm、4°Cの条件で20分間遠沈操作に付して、18.9 gの沈澱を回収した。これに直ちに蒸留水を加えて全量190 ml (100 mg/m1) とし、等容量(190 ml)の熱90%フェノールを加えて、68°C (65~70°C)で20分間攪拌した。次いで、氷水中で10°C以下に冷却し、上記と同一条件の遠心分離により上層(水層)を回収した。中間層及びフェノール層に蒸留水100 mlを加え、再度、加熱抽出した。次いで、上記と同一の条件で遠心分離にかけ、分取した上層を前記の上層と合わせて透析チューブに入れ、蒸留水に対して透析した。この際、フェノール臭がなくなるまで、外液を10回交換した。透析後、透析チューブの内液を回収した(250 ml)。ファルマシア社製のQ-セファロースを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。400 mM NaAcでの溶出液を回収した。分子量20万カットのU*

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白量} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

【0033】分子量

LPSaを蒸留水に溶解して2 mg/m1溶液を調製し、その10 μlを1.5 ml容プラスチックチューブに入れた。これに、別途、180 μlの10% (w/v) SDS、45 μlの5% β-メルカプトエタノール、90 μlのCBB色素溶液、112.5 μlの0.5Mトリス塩酸(pH 6.8)及び22.5 μlの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10 μlを加えてよく混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸した。この加熱後直ちに氷水中に浸して急冷した。

【0034】10 mlの10% (w/v) SDS、17.9 gのトリシン及び3.03 gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をマリソル社製のスラブゲル電気泳動槽に入れた。20%ボリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50 Vに1時間、次いで、150 Vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を続けた(本明細書でこの泳動法をトリシン-SDS-PAGE法と称す)

* Fフィルターを使って限外ろ過して、塩及び低分子の夾雜物を除去した。限外ろ過内液を回収して、凍結乾燥した。

【0030】かくて精製されたLPSaの物性は次の通りであった。

収量: 13.0 mg

リムラス比活性: 2.2

全糖含量: 37.0 重量%

夾雜蛋白量: 2.98 重量%

10 夾雜核酸量: 3.68 重量%未満

【0031】収量は、生化学工業株式会社からトキシカラーシステムという名称で市販されている試薬キットを使ったリムラステストによる大腸菌LPS換算値である。リムラス活性は、同キットの検量線用標品(大腸菌0111:B4 LPS, 345 pg/EU)より算出したLPS重量と、LPS収量の比率より算出した比活性である。糖はフェノール-硫酸法 [エム・デュボイス (M. Dubois) 等著、アナリティカルケミストリ (Analytical Chemistry), Vol. 28, 350頁, 1956年]、蛋白はローリー法 [オーライエチルローリー (O. H. Lowry) 等著、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリ (Journal of Biological Chemistry), Vol. 193, 65頁, 1951年]で測定した。又、核酸量は260 nmと300 nmでのODの差に基づいて計算し(1 OD = 50 μg)、純度(%)は次式に基づき計算した。

【0032】
【数1】

20 【0033】分子量

61-0443を使い銀染色を室温で行って、挙動を確認した。

【0035】同時に泳動させた蛋白分子量マーカー [ファルマシア社製のLMWキットE:ホスホリラーゼb (94 k)、アルブミン (67 k)、オブアルブミン (43 k)、カーボニックアンヒドライゼ (30 k)、トリプシンインヒビター (20 k)、α-ラクトアルブミン (14.4 k); ファルマシア社製のポリペプタイド分子量測定キット17-0551-01:ミオグロビン (17.2 k)、ミオグロビンI+II (14.6 k)、ミオグロビンI (8.2 k)、ミオグロビンII (6.4 k)、ミオグロビンIII (2.6 k)]の泳動位置から本発明のLPSの分子量を計算したら、5,000 ± 1,500 であった。上記銀染色における染色帯を図1に示す。図1で、番号1がLPSaの、番号2が参考として測定された大腸菌LPSの染色帯である。

【0036】リンモル数

チェンートリバラ (Chen-Toribara) 法
[チェン等著、「アナリティカル ケミストリ (Analytical Chemistry)」、vol. 2 8、1756~1758頁 (1956年) に準拠して次の通りに行った。

【0037】LPSaを蒸留水に溶解して、40 μgのLPSを含む20 μlの溶液を調製し、小試験管に入れた。20 μlの50 v/v%硫酸を添加し、160°Cで2時間加熱した。次いで、20 μlの10 v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後に0.5 mlの蒸留水、次いで0.5 mlの反応試薬 (1 mlの6N硫酸、2 mlの蒸留水、2 mlの2.5 v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1 mlの10 v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5 mlを使用) を添加して室温で30分間放置した後に、820 nmでの吸光度OD (820 nm) を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、*

$$\text{リン量 (重量\%)} = \frac{\text{サンプル吸光度}}{0.67 \times (\text{サンプル濃度}) \times 0.05}$$

【0040】リンモル数2.0±1は、次式により計算した、分子量5,000当たりの換算数である。

【数3】

$$\text{リン量 (重量\%)} = \frac{5,000}{100} \times \frac{1}{31}$$

【0041】ヘキソサミンモル数

エルソン-モルガン (Elson-Morgan) 法
(東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の377~379頁) に準拠して次の通りに行った。

【0042】LPSを蒸留水に溶解して2.0 mg/mlの溶液を調製し、その100 μlをスクリュークリップ付きスピツ (イワキガラス株式会社製) に入れ、これに100 μlの8NHC1を添加して110°Cで16時間加熱した。4N NaOHを約200 μl添加してpH 7とした。その100 μlを分取し、別のスクリュークリップ付きスピツに入れ、200 μlの下記試薬Aを加えた後に、105°Cで1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100 μlを分取し、670 μlの9.6%エタノールを加え、更に、67 μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535 nmで吸光度を測定した。検量線作成用試料としては0.20~200 μg/mlのN-アセチル グルコサミン (和光純薬株式会社製) を使った。

【0043】(試薬A) 75 μlのアセチルアセトンと2.5 mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製した。

【0044】(試薬B) 1.6 gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30 mlの濃塩酸と30 mlの9.6%エタノールを混合して調製した。

* リン酸二水素カリウム (和光純薬株式会社製) を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ2.5 μg、1 μg、0.25 μg、0 μgを含む0.5 mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1 gはリン酸二水素カリウム4.39 gに相当する。結果、吸光度は0.253 (0.194、0.262、0.303の平均値) であった。この値は、無機リンの混入 (例えば、リン酸緩衝液に由来する) による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。

【0038】吸光度から計算したリン量は0.27 μgであり、その重量%0.67は、次式により計算した。なお、式中の「0.67」は、標準のリン1 μgのOD値を指し、サンプル濃度は、蒸留水に溶解したLPSの濃度 (mg/ml) を指す。

【0039】

【数2】

サンプル吸光度

【0045】LPSaのヘキソサミンモル数は9.1±1/分子量5,000だった。

【0046】KDOモル数

KDO (2-ケト-3-デオキシオクトネート) モル数を、ジフェニルアミン法 [シャビ アール (Shaby R.) 等著、アナリティカル バイオケム (Analytical Biochem.)、58 (1)、123~129頁 (1974年)] に準拠して次の通りに決定した。

【0047】500 mgのジフェニルアミン、5 mlのエタノール、45 mlの冰酢酸、50 mlの濃塩酸 (全て和光純薬株式会社製) を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500 μlに、1.0 mg/mlのLPSaを含む250 μl蒸留水溶液を合わせ、100°Cの沸騰水浴中で33分間加熱後に冷水 (24.5°C) 中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を用い420、470、630、650 nmでの紫外外部吸収を測定した (測定値を各々A420、A470、A630、A650とする)。標準試料としては、0.5 μmol/mlのKDOアンモニウム塩 [米国シグマ (Sigma) 社製] を含む蒸留水250 μlを使用した。

【0048】検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。
 $S = A420 - A470 + A630 - A650$

【0049】検体試料の値 (S_t) は0.083であった。標準試料の値 (S_s) は0.246であり、蒸留水のみの値は0.005であった。この値の比較により、LPSaには、0.8±0.5/分子量5,000のKDOが含まれると推定された。この値は、次のように計算された。

50 算された。

【0050】溶液に含まれるKDOの濃度を x (μ モル/m1) とすると、次式から、 $x = 0.16$ となつた。

【0051】

【数4】

$$\frac{0.5}{0.248} = \frac{x}{0.083-0.005}$$

$$y = x \times 10^{-3} \times \frac{5,000}{1 \times 10^{-3}} = 0.8$$

【0054】同様にして測定された大腸菌LPSの物性は次の通りであった。

大腸菌LPSの物性

分子量：10,000 (トリシン-SDS-PAGE法による)

リンモル数：2.4/分子量1万

ヘキソサミンモル数：5.1/分子量1万

KDOモル数：0.6/分子量1万

全糖含量：16.7重量%

夾雜蛋白量：10.10重量%

夾雜核酸量：5.00重量%未満

【0055】以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、実施例2～5におけるLPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

【0056】実施例2 (錠剤)

LPS	0.04 g
6%HPC乳糖	178 g
ステアリン酸タルク	8 g
バレイショデンブン	14 g

以上を混和し、打錠して、0.1mgのLPSを含む0.5gの錠剤400個を調製した。

【0057】実施例3 (内用液剤)

LPS 1 mg

* 【0052】従つて、LPSaの1モル(5,000と仮定)に含まれるKDDのモル数を y とすると、次式により、 $y = 0.8$ となつた。

* 【0053】

【数5】

※精製水 100ml

【0058】

LPS	0.1 g
精製ラノリン	80.0 g
黄色ワセリン	適量
	1000g

【0059】実施例5 (注射剤)

LPS	0.5 mg
注射用蒸留水	適量

20 合計 1000ml

【0060】実験例1 (TNF産生効果)

各群3匹のマウス(7週齢の雄C3H/He。平均体重23.7g。)の尾静脈に、1匹当たりリムラス活性量で0.01、0.1、1.0、又は10 μ gのLPSa又は対照としての大腸菌LPSを含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その1時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として次表1に示す。

【0061】

30 【表1】

LPS量 (μ g/匹)	TNF活性 (単位/ml)
LPSa 0.01	0.8±2.0
0.1	2.4±1.6
1.0	8.3±2.7
10	10.2±2.0
大腸菌LPS 0.1	0.2±0.2
1.0	5.5±3.0
10	8.6±4.1

【0062】図2は、表1に示された結果を、縦軸に相対的TNF活性(単位/ml)を、横軸にLPS量(μ g/匹)を示し、曲線でむすんだものである。この曲線から、5単位/ml(最大産生量の約半量)のTNFを産生するのに必要な量は、マウスの体重1kg当たりL

PSaで0.014mg、大腸菌LPSで0.035mgであると推定される。即ち、LPSaのTNF産生効果は大腸菌LPSの約2.5倍に達すると推定される。

【0063】実験例2 (TNF産生促進効果)

50 各群3匹のマウス(7週齢の雄C3H/He。平均体重

23. 6 g。) の尾静脈に、1匹当たりリムラス活性量で0. 01、0. 1、1. 0、又は10 μ gのLPS a又は対照としての大腸菌LPSを含む生理的食塩水0. 2 mlを注射し、その3時間後に3KE [(クリニッショーンハイド (Klinische Einheit) 系単位であり、1KEは0. 1 mgの乾燥細菌を含む製剤量に当たる) のOK432を含む生理的食塩水 *]

* 0. 2 mlを同じく尾静脈から注射し、その2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として次表2に示す。

【0064】

【表2】

LPS量 (μ g/匹)	TNF活性 (単位/ml)
LPS a	38.0 ± 9.9
	84.9 ± 54.4
	147.4 ± 67.4
	46.4 ± 27.3
大腸菌LPS	137.7 ± 74.1
	41.9 ± 5.1
	13.4 ± 5.1
生理的食塩水	7.4 ± 3.8

【0065】図3は、表2に示された結果を、縦軸に相対的TNF活性 (単位/ml) を、横軸にLPS量 (ng/匹) を示し、曲線でむすんだものである。この曲線から、100単位/mlのTNFを産生するのに必要な量は、マウスの体重1 kg当たりLPS aで1. 9 ng、大腸菌LPSで8. 9 ngであると推定される。即ち、LPS aのTNF産生促進効果は大腸菌LPSの約4. 7倍に達すると推定される。

【0066】投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人 (60 kg) で、経口投与で1 μ g ~ 100 mg、静脈投与で10 ng ~ 10 mg、経皮投与で100 ng ~ 1 mgが1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1 kg当たりの量の目安とし、豚、

犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1 kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1 kg当たりの量の目安として投与できる。

【0067】なお、8週齢の平均体重23. 7 gのBA LB/c雄マウスに1匹当たり重量で9 (2匹)、27 (6匹)、80 (4匹)、240 (2匹) μ gのLPS aを含む生理的食塩水0. 2 mlを尾静脈より注射して48時間観察したところ、死亡例は無かった。一方、大腸菌LPSでは、9 μ g投与群、27 μ g投与群では死亡例は無かったが、80 μ g投与群では6例中2例が死※50

※亡し、240 μ gを投与されたマウス2匹は全例が死亡した。これから推定して、LPS aのLD50は8. 9 mg/kgを越えており、この値は、大腸菌LPSの推定LD50値2. 9 mg/kgの優に3倍以上に達する。

【0068】この毒性値を考慮した化学療法係数を比較すると、LPS aは大腸菌LPSに比べて、TNF産生効果で約8倍、TNF産生促進効果で約15倍に達すると計算される。

【0069】

【発明の効果】本発明により、高い免疫機能活性化能を有し、極めて低毒性で、化学治療係数が高く、長期使用が可能であり、経口、経皮、注射のいずれの経路でも投与可能であり、しかも、生産コストが安く、大量に供給可能な新規なLPS、それを产生する新規な細菌、同LPSを含む新規な免疫機能活性化剤及び動物用免疫機能活性化剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のLPSの、トリシン-SDS-PAGE法における染色帯を示す図である。

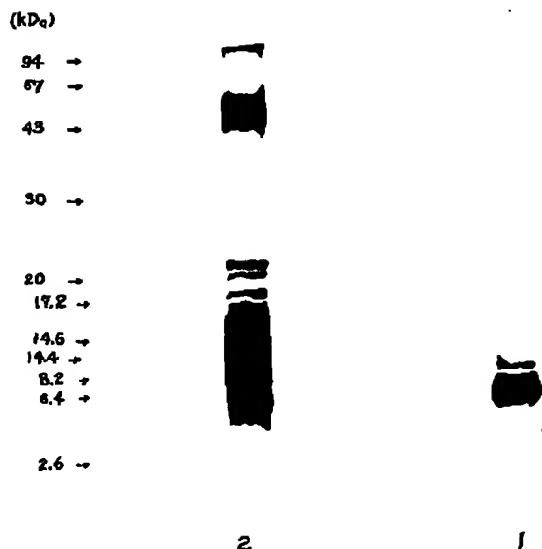
【図2】本発明のLPSのTNF産生効果を、大腸菌LPSとの対比で示すグラフである。

【図3】本発明のLPSのTNF産生促進効果を、大腸菌LPSとの対比で示すグラフである。

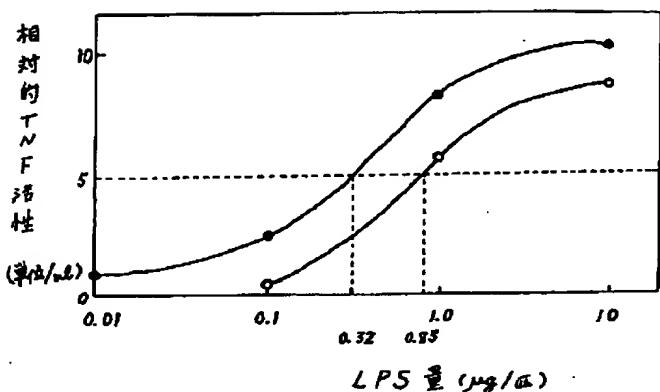
【符号の説明】

図1において、1は本発明のLPSの、2は大腸菌LPSのデータを示す。図2、図3において、○は本発明のLPSの、○は大腸菌LPSのデータを示す。

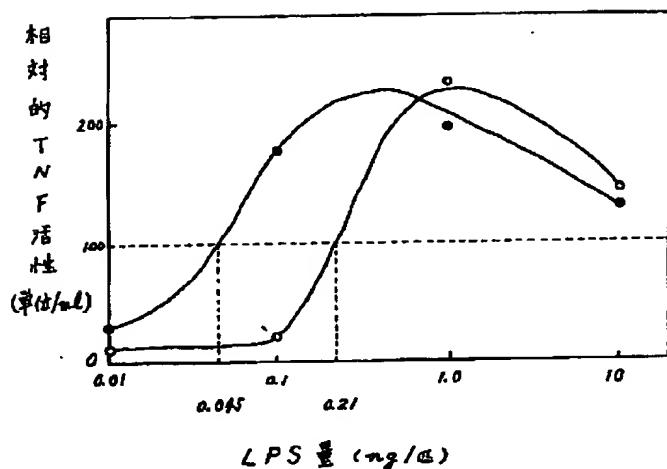
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5
C 12 R 1:01)

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

(72) 発明者 西沢 孝志
東京都北区西ヶ原2-35-12